



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10179174 A**(43) Date of publication of application: **07 . 07 . 98**

(51) Int. Cl.

C12N 15/09
A01H 1/00
/(C12N 15/09 , C12R 1:91)

(21) Application number: **09295569**(22) Date of filing: **28 . 10 . 97**(30) Priority: **08 . 11 . 96 JP 08296809**(71) Applicant: **HOKKO CHEM IND CO LTD**(72) Inventor: **YAMAGUCHI MASANORI**
TERAKAWA TERUHIKO(54) **TRANSFORMATION OF PLANT AND PRODUCTION OF TRANSGENIC PLANT**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a process for the transformation of a plant and the production of a transgenic plant in high transforming ratio.

SOLUTION: A transgenic plant is produced by the following steps (a) to (d). (a) A step to disperse plant cells or a tissue containing plant cells together with a

foreign gene and a whisker in a liquid, (b) a step to centrifuge the dispersion to effect the adhesion of the whisker to the plant cell, (c) a step to apply ultrasonic wave to the product of the step (b) to effect the vibration of the whisker to form a hole on the plant cell and introduce the foreign gene through the hole into the plant cell and (d) a step to regenerate a plant from the plant cell containing foreign gene introduced in the step (c) or from a plant tissue containing the cell.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-179174

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl.⁶

C 1 2 N 15/09

A 0 1 H 1/00

// (C 1 2 N 15/09

C 1 2 R 1:91)

識別記号

Z N A

Z N A

F I

C 1 2 N 15/00

A 0 1 H 1/00

Z N A A

A

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願平9-295569

(22) 出願日 平成9年(1997)10月28日

(31) 優先権主張番号 特願平8-296809

(32) 優先日 平8(1996)11月8日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000242002

北興化学工業株式会社

東京都中央区日本橋本石町4丁目4番20号

(72) 発明者 山口 将憲

神奈川県座間市栗原1277-1 相武台ホワ

イトレジデンスB102

(72) 発明者 寺川 輝彦

神奈川県厚木市森の里2-1-6-103

(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法

(57) 【要約】

【課題】 形質転換率の高い、植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法を提供する。

【解決手段】 次の (a) ~ (d) の各工程により、形質転換植物を作出する。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、

(b) 工程 (a) の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、

(c) 工程 (b) の後に、超音波処理を行い、ウイスカを振動させて、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。

(d) 工程 (c) で外来遺伝子が導入された植物細胞又はこれを含む植物組織から植物体を再生する工程。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 次の(a)～(c)の各工程を含むことを特徴とする植物の形質転換方法。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。

【請求項2】 前記外来遺伝子が、塩基性物質と複合体を形成している遺伝子である請求項1記載の方法。

【請求項3】 次の(a)～(d)の各工程を含むことを特徴とする形質転換植物の作出方法。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。(d) 工程(c)で外来遺伝子が導入された植物細胞又はこれを含む植物組織から植物体を再生する工程。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

【発明の属する技術分野】 本発明は、効率のよい植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 細胞に遺伝子を導入して植物細胞を形質転換し、形質転換植物を得ようとする試みが、いくつか知られている。

【0003】 例えば、シリコンカーバイドファイバーなどのウイスカを用いて、植物細胞を液体混合下で激しく混合し、その操作によって穿孔して、外来遺伝子を導入する方法(以下、「ウイスカ法」と略す)(米国特許第5302523号明細書、米国特許第7472538号明細書、Kaepfer, H. F. ら、1992年、「Theoretical and Applied Genetics」、第84巻、560～566頁、Asano, Y. ら、1991年、「Plant Science」、第79巻、247～252頁)、植物細胞に超音波を照射して、細胞を部分的に損傷させ、損傷箇所を通して遺伝子を導入する方法(Joersbo, M. ら、1990年、「Plant Cell Reports」、第9巻、207～210頁、Joersbo, M. ら、1992年、「Physiologia Plantarum」、第85巻、230～234頁)があるが、いずれの方法によっても効率よく形質転換植物は得られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 従来のウイスカ法や超

音波法による遺伝子導入方法では、形質転換体は得られ難く、実用的な植物の形質転換方法とは言い難い。

【0005】 従って、双子葉および単子葉植物細胞に効率的に遺伝子を導入し、形質転換植物を得る方法の開発が望まれている。

【0006】 本発明は、上記の問題点を解決し、形質転換率の高い、植物の形質転換方法および形質転換植物の作出方法を提供することを課題とする。

【0007】

10 **【課題を解決するための手段】** 本発明者らは、これらの目的を達成するために鋭意研究した。その結果、植物細胞または植物組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させた状態において、遠心処理ならびに超音波処理を行うことにより、外来遺伝子を細胞内に導入して、外来遺伝子が発現する形質転換細胞を効率よく得て、これを再生することにより、形質転換植物が得られることを見い出した。

20 **【0008】** すなわち、第1の本発明の要旨とするところは、次の(a)～(c)の各工程を含む、植物の形質転換方法にある。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。

30 **【0009】** また、第2の本発明の要旨とするところは、次の(a)～(d)の各工程を含むことを特徴とする形質転換植物の作出方法にある。

(a) 植物細胞又は植物細胞を含む組織を外来遺伝子およびウイスカとともに液体中に分散させる工程、(b) 工程(a)の後に、遠心処理を行い、前記植物細胞にウイスカを付着させる工程、(c) 工程(b)の後に、超音波処理を行い、ウイスカにより、前記植物細胞を穿孔せしめ、この孔から細胞中に外来遺伝子を導入する工程。(d) 工程(c)で外来遺伝子が導入された植物細胞又はこれを含む組織から植物体を再生する工程。

【0010】

40 **【発明の実施の形態】** 以下に本発明の方法を詳細に説明する。本発明の植物の形質転換方法は、上記(a)～(c)の各工程からなり、本発明の形質転換植物の作出方法は、上記工程にさらに(d)工程を付加したものである。

【0011】 以下に、(a)、(b)、(c)、(d)の各工程を詳細に説明する。

【0012】 [1] 工程(a) 分散工程

50 本発明は、植物細胞又は植物組織を、外来の遺伝子とウイスカとともに液体中に均一に分散し、懸濁させた状態にする工程である。

【0013】本発明の方法が適用される植物は特に限定されるものではなく、例えば、イネ、トウモロコシ、コムギ、オオムギ、芝草、その他の単子葉植物、または、タバコ、ダイズ、ワタ、トマト、ハクサイ、キュウリ、レタスなどの双子葉植物などが挙げられる。

【0014】本発明に使用される植物細胞としては、例えば、カルスや懸濁細胞などの脱分化した培養細胞、不定胚、苗条原基などが、植物組織としては、葉、根、茎、胚、生長点などが挙げられるが、好ましくは、カルスおよび懸濁細胞などの植物細胞である。

【0015】また、本発明に用いられる培養細胞は、植物由来のいかなる外殖であってもよく、例えば、胚盤、生長点、花粉、葯、葉身、茎、葉柄、根由来のものが挙げられる。

【0016】また、本発明に用いられる培養細胞は、上記した外殖片をカルス形成培地、例えばMS培地(Murashigeら、「Physiologia Plantarum」、1962年、第15巻、473頁~497頁)または、R2培地(Ojimaら、「Plant and Cell Physiology」、1973年、第14巻、1113~1121頁)、N6培地(Chura、1978年、「In Proc. Symp. Plant Tissue Culture, Science Press Peking」、43頁~50頁)など、必須成分として無機塩成分およびビタミン類を含む培地に、植物ホルモンとして、例えば、2, 4-PA (2, 4-dichlorophenoxyacetic acid) 0.1~5mg/リットル、ならびに、炭素源として、例えば、ショ糖10~60g/リットル、ゲルライト1~5g/リットルを添加した培地に置床して培養することにより得られる。

【0017】カルス形成培地に外殖片を置床した後、本発明に用いられる培養細胞が得られるまでの培養期間は特に限定されるものではないが、形質転換植物を得ようとする場合には、当該培養細胞からの植物体再生が可能であること、つまり、当該植物細胞が植物体再生能力を保有している期間内であることが重要である。

【0018】また、本発明に用いる培養細胞は植物体再生能力を保有している培養細胞であれば、液体培地による懸濁細胞であってよい。

【0019】本発明に用いるウイスカ (whisker) とは、微細な針状の構造を持った単結晶をいう。本発明に用いるウイスカとしては、細胞に刺さり、細胞壁を貫いて、細胞表面に孔を形成させ、この孔を経て、外来遺伝子を細胞内に導入することができるものであれば、なんら限定されるものではないが、孔の寸法が細胞の大きさと比較して、大きすぎるものであってはならない。具体的には、直径が0.01~10μm、好ましくは、0.5~1μm、長さが、1~100μm、好ましくは3~40μmである。ウイスカ材質が、チタン酸カリウム、

炭酸カルシウム、ホウ酸アルミニウム、窒化ケイ素、酸化亜鉛、塩基性硫酸マグネシウム、マグネシア、ホウ酸マグネシウム、二ホウ化チタン、カーボングラファイト、硫酸カルシウム、サファイア、シリコンカーバイドなどが挙げられ、好ましくはチタン酸カリウム、炭酸カルシウム、ホウ酸アルミニウムである。

【0020】本発明に用いるウイスカは、表面処理を行わなくとも単独で使用することもできるが、ウイスカ表面に塩基性官能基を持つウイスカ、好ましくは表面処理剤により表面処理されているウイスカを使用することにより形質転換率を高めることができる。その際の塩基性官能基とは、1~4級アミン類、2価金属錯体などによる塩基性官能基が挙げられるが、好ましくは、アミノ基が用いられる。

【0021】ウイスカ表面への塩基性官能基の付与に用いる化合物は、ウイスカ表面と共有結合できる化合物であれば、特に限定されないが、好ましくは、シランカップリング剤、より好ましくは塩基性官能基を有するシランカップリング剤である。シランカップリング剤としては、3-(2-アミノエトキシ)アミノプロピル-トリメトキシシラン、3-アミノプロピル-トリエトキシシランなどの塩基性シランカップリング剤を挙げることができるが、塩基性官能基を有するシランカップリング剤であれば、これらに限定されるものではない。

【0022】本発明に用いられる外来遺伝子は、植物の形質転換に用いられる核酸であり、DNA、RNAを問わないが、通常はDNAが用いられる。ここで形質転換とは、植物細胞内に遺伝子を導入することをいい、その遺伝子の発現の有無は問わないが、植物細胞内でその遺伝子が安定に保持されることが好ましい。また、遺伝子は、タンパク質もしくはペプチド又はアンチセンスRNA等をコードし、植物細胞内でこれらを発現するものであってもよいし、染色体中の遺伝子内部に挿入され、その遺伝子の正常な発現を阻害するものであってもよい。

【0023】本発明に用いられるDNAの形態としては、二本鎖DNA及び一本鎖DNA、環状DNA(プラスミド)、直鎖状DNAのいずれであってもよい。本発明の遺伝子を植物細胞に導入した後に、その遺伝子を発現させようとする場合には、その遺伝子固有のプロモーター又はターミネーターが機能可能な場合にはそのまま用いてもよいが、植物細胞内で効率よくあるいは特異的に機能するプロモーター又はターミネーターと入れ替えてもよい。

【0024】例えば、植物体内で機能するプロモーターとしてカリフラワーモザイクウイルス由来のCaMV35Sプロモーター(Odellら、1988年、「Plant Mol. Biol.」、第10巻、263~272頁)が挙げられ、ターミネーターとして、カリフラワーモザイクウイルス由来のターミネーターや、アグロバクテリウムのノパリン合成酵素遺伝子由来のターミ

ネーターが挙げられる。

【0025】本発明に用いる外来遺伝子として具体的には、例えば除草剤耐性遺伝子、昆虫耐性遺伝子、ウイルス抵抗性遺伝子、耐病性遺伝子、貯蔵タンパク遺伝子、さらに選抜マーカーとしての薬剤耐性遺伝子などが挙げられるが、植物体内で機能する外来遺伝子であれば特に限定されるものではない。

【0026】本発明に用いられる外来遺伝子はそのまゝ使用することもできるが、塩基性物質と静電的にイオン結合した複合体を形成させることにより、形質転換率を

【0027】外来遺伝子と結合し、複合体を形成することのできる塩基性物質としては、例えば、スペルミン、スペルミジン、d i-リジン、t r i-リジン、ポリリジン、d i-アルギニン、t r i-アルギニン、ポリアルギニン、d i-オルニチン、t r i-オルニチン、ポリオルニチン、ヒストンH1、ヒストンH2、ヒストンH3、ヒストンH4などが挙げられ、水溶液中で正電荷を持つ物質であれば特に限定されないが、ポリオルニチン、スペルミン、スペルミジン、ヒストン、d i-リジン、t r i-リジンが好ましい。またこれらの塩基性物質は2種以上混合して使用してもよい。

【0028】これらの塩基性物質は外来遺伝子は、外来遺伝子を植物細胞内で安定に保つことと、染色体に組み込みやすくするために使用する。外来遺伝子に対する塩基性物質の量は、外来遺伝子が10 μ gに対して塩基性物質が0.1~300 μ g、好ましくは1~80 μ g使用される。

【0029】次に、植物細胞または、植物組織、ウイスカおよび外来遺伝子を分散させる液体は、植物細胞とウイスカとを懸濁させ、外来遺伝子を溶解させる目的で使用され、蒸留水、等張液、緩衝液、組織培養用培地などが挙げられる。

【0030】その際の等張液としては、例えばKCl、NaCl、CaCl₂、MgCl₂などの無機塩を添加して0.01~7M、好ましくは、0.5~2Mにした液体が挙げられる。緩衝液としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、MES緩衝液などが挙げられる。

【0031】組織培養用培地としては、例えばMS培地としては、例えばMS培地、ガンボルグのB5培地、R2培地、ホワイト培地、ニッチーニッチ培地、N6培地などが挙げられる。

【0032】等張液または組織培養用培地を用いる場合は糖類を添加して用いるのがよく、その際の糖類としては、例えばショ糖、果糖、ブドウ糖、ソルビトール、マンニトールなどが挙げられ、糖類の濃度は0.01~7M、好ましくは0.5~2Mで使用される。

【0033】本発明に用いる液体のpHは、pH4~8、好ましくはpH5~7である。本発明に用いる液体の容量は、特に限定されるものではないが、植物細胞の

容量(圧縮細胞量:Packed Cell Volume、以下、「PCV」と略す)がPCV 1mlに対して、10 μ l~2ml、好ましくは、300~700 μ lになるよう調整して用いる。

【0034】本発明に用いる植物細胞の容量は、特に限定されるものではないが、植物細胞と共に液体中に混合されるウイスカの量は植物細胞の容量に伴い調整され、植物細胞量のPCV 1ml当たり、ウイスカ1~100mg、好ましくは、4~40mgになるように添加される。

【0035】本発明に用いる外来遺伝子、または外来遺伝子の塩基性物質との複合体の量は、PCV 1mlに対して、0.1~1000 μ g、好ましくは、10~200 μ gになるように添加される。

【0036】このようにして得られた上記植物細胞、ウイスカおよび外来遺伝子は液体と一緒に同一容器に加えて混合する。本発明で使用する容器は、例えば、遠心管、ガラス試験管、ポリプロピレン製試験管、シャーレ、フラスコなどが使用できるが、無菌で取り扱える容器であれば、これらに限定されるものではない。

【0037】植物細胞、ウイスカおよび外来遺伝子は、液体中で均一に混合され、分散されるよう容器を振って攪拌するが、特に激しく攪拌する必要はない。このようにして、液体中に分散させた植物細胞、ウイスカおよび外来遺伝子の混合物(以下、「混合物」と略す)を得ることができる。

【0038】〔2〕工程(b) 遠心処理

本工程は、混合物を遠心処理することによりウイスカを植物細胞へ付着させる工程である。本発明における遠心処理は、遠心加速度が3,000~50,000 \times g、好ましくは、10,000~30,000 \times gで、遠心時間が、10秒~40分、好ましくは、5~10分間行う。また、植物細胞へのウイスカの付着量を高めるために同様の遠心処理を1~20回、好ましくは、3回繰り返して行うのよい。

【0039】〔3〕工程(c) 超音波処理

本工程は、遠心処理を行った後、混合物を超音波照射することによりウイスカを振動させ、ウイスカにより細胞を穿孔し、外来遺伝子を孔から細胞内に導入させる工程である。

【0040】本発明に用いる超音波処理は、前記した従来技術よりも穏やかな条件、すなわち、周波数が1k~1MHz、好ましくは、10~60kHzで、照射時間が0.2秒~20分間、好ましくは、30秒~2分間で、強度は、0.01~10W/cm²、好ましくは、0.1~1W/cm²で照射を行う。

【0041】超音波処理を行った後、外来遺伝子を細胞内に侵入させ拡散させるのに十分な時間、混合物を静置する。その際の温度は0~28℃、好ましくは4℃で、静置時間は1分~3時間、好ましくは5~10分間静置

するほうがよい。

【0042】本発明においては、ウイスカの使用と超音波処理を組み合わせることでウイスカを細胞内に侵入させることができるため、細胞に重大な損傷を与えることなく高い形質転換効率が得られると推定される。

【0043】〔4〕工程（d）植物体再生工程
本工程は、（c）工程で得られた形質転換細胞から植物体を再生させて形質転換植物の作出を行う工程である。

【0044】本工程を行うにあたって、発現可能な外来遺伝子を植物細胞に導入した場合には、上述の如く、遠心処理と超音波処理を行った後、予め植物細胞を培養して外来遺伝子を発現させる。

【0045】上記のようにして超音波処理された混合物は、そのまま培養することもできるが、好ましくは、混合物からウイスカと外来遺伝子を取り除くため洗浄を行う。その際に用いる洗浄液は、蒸留水、等張液、緩衝液、培地などが挙げられるが、好ましくは、前述の等張液または培地を用いる。

【0046】洗浄は、滅過等の操作によって、混合物から植物細胞を取り出すことができればよく、特に操作が限定されることはないが、例えば、40 μ m のナイロンメッシュ等の篩を用いて混合物を洗浄し、植物細胞を取り出すことができる。

【0047】このようにして得られた植物細胞を、植物組織培養用培地を用いて、培養する。この際用いられる培地は、前述した植物組織培養用培地に必要に応じて、植物ホルモンとして、例えば、2, 4-PA、ナフタレン酢酸、インドール酢酸などのオーキシシン類、ベンジルアデニン、カイネチンなどのサイトカイニン類を単独もしくは混合して用い、炭素源として、例えば、ショ糖、グルコースなどを添加して用いることができるが、形質転換の目的とする植物種に応じて培地の選択をすることができる。

【0048】培養は、液体培地もしくは、固体培地で15～30℃、好ましくは、20～28℃、培養期間は6時間～7日間、好ましくは、2～3日間で行うことによって、外来遺伝子を植物細胞内で発現させた分裂細胞を得ることができる。

【0049】この際、これらの分裂細胞は、外来遺伝子が導入され、形質転換された形質転換細胞と非形質転換細胞とが混在しており、効率的に形質転換植物を得るために、形質転換細胞を分裂細胞の中から選抜し、分離することが望ましい。

【0050】例えば、導入に用いた外来遺伝子上に選抜マーカーとなる薬剤耐性遺伝子、例えば、抗生物質ハイグロマイシン耐性遺伝子を保有させておくことにより、薬剤による細胞の代謝阻害効果を利用して、形質転換細胞を選抜することができる。この選抜を行うためには、前記に得られた分裂細胞をあらかじめ指標となる薬剤を

添加した植物組織培養用培地から成る固体もしくは液体の選抜培地に置床、もしくは懸濁し、20～60日間、好ましくは30～40日間培養する。

【0051】選抜培地に添加される薬剤は、例えばハイグロマイシン、カナマイシンなどを用いることができ、濃度は1～300mg/リットル、好ましくは25～50mg/リットルで用いるが、薬剤の種類、濃度は植物種に応じて選択することができ、特にこれらに限定されるものではない。

10 【0052】また、外来遺伝子の種類により形質転換細胞数も変動する。例えば、ハイグロマイシン耐性遺伝子を用いた場合、GUS遺伝子よりも形質転換細胞が減少する傾向にある。

【0053】本発明における植物体再生方法としては、上記のようにして得られた形質転換細胞を公知の植物体再生用培地に置床することにより行うことができる。

【0054】植物体再生用培地に置床された形質転換細胞は15～30℃、好ましくは、20～28℃で、光照射は500～2,000ルクス、好ましくは、800～1,000ルクスで、培養期間は、20～60日間、好ましくは30～40日間培養すると、個々の細胞から目的とする外来遺伝子が導入され、形質転換された植物体が再生する。

【0055】

【実施例】以下に、本発明の実施例を示して具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらに限定されるものではない。

【0056】

【実施例1】

30 <1>工程（a）

（1）供試植物細胞の調製

イネ（品種日本晴）完熟種子の籾を脱穀し、70%エタノール溶液に10秒間、次いで有効塩素約1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に6分間浸漬して殺菌処理した後、滅菌水で洗浄した。

【0057】MS培地の無機成分組成にショ糖30g/リットル、2, 4-PA 2mg/リットル、寒天8g/リットルを添加して得た培地（pH5.8）を直径90mmのシャーレに入れて固化させて固体培地を調製した。

【0058】この固体培地に上記で得た種子を1シャーレに9個置床し、28℃で14日間、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）にて培養し、カルスを得た。R2培地の無機成分組成にショ糖30g/リットル、2, 4-PA 2mg/リットル、カサミノ酸2g/リットルを添加して得た液体培地（pH5.8）を100ml容の三角フラスコに50ml入れて、オートクレーブにより滅菌処理を行い、液体培地を調製した（以下、この液体培地を「R2D2培地」と略す。）

50 【0059】このR2D2培地に上記で得たカルスを胚

乳から切りだし、これを1フラスコ当たり10個移植し、温度28℃で、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）にて、ロータリーシェーカー（100rpm/分）を用いて振盪培養することによって懸濁培養細胞を得た。この懸濁培養細胞は7日ごとに、PCVで3mlを新鮮なR2D2培地に移植し、継代培養した。継代培養28日後のイネカルスを、孔1mmのステンレスメッシュの篩を用いて、1mm以下のカルスを1シャーレ当たりPCVで3ml得た。

【0060】得られた1mm以下のイネカルスはR2D2培地で3回洗浄し、試験に供した。

【0061】（2）ウイスカの調製

チタン酸カリウム製ウイスカ（チタン工業株式会社の製品「LS20」）5mgを1.5ml容のチューブ（エッペンドルフ社製）に入れ、エタノールを0.5ml加えて、一晚放置後、エタノールを完全に蒸発させて、殺菌されたウイスカを得た。このウイスカの入ったチューブに滅菌水1mlを入れ、よく攪拌した後、これを3000rpm/分、5分間遠心分離し、上清の水を捨てウイスカを洗浄した。この洗浄操作を3回行った後、同チューブ内にR2D2培地を0.5ml加えてウイスカ懸濁液を得た。

【0062】（3）外来遺伝子の調製

外来遺伝子はβ-グルクロニダーゼ（GUS）遺伝子保有のpBI221（クローンテック社製）を用いた。

【0063】プラスミド（pBI221）は1mg/mlの濃度でTE緩衝液（Tris-HCl 10mM、EDTA 1mM、pH8.0）に溶解し、使用した。

【0064】（4）GUS遺伝子の導入操作

上記（2）で得られたウイスカ懸濁液の入ったチューブに上記（1）で得られた1mm以下のカルスをPCVで250μl入れて、攪拌後、1,000rpm/分で10秒間遠心を行い、カルスとウイスカを沈殿させ、上清を捨て、カルスとウイスカの混合物を得た。

【0065】また、上記（3）で得たGUS遺伝子溶液20μl（20μg含有）に対してR2D2培地10μlを加え、混合した後、上記のカルスとウイスカの混合物の入ったチューブに加え、カルス、ウイスカおよび外来遺伝子が添加された混合物を十分振り混ぜて混合物を得た。

【0066】＜2＞工程（b）

次に、この混合物の入ったチューブを18,000xgで5分間遠心分離し、遠心後、再度振り混ぜた。この遠心分離し、再度振り混ぜる操作を3回行った。

【0067】＜3＞工程（c）

（1）超音波処理

このようにして得た混合物の入ったチューブを超音波発生機（浴槽型：媒体として水を使用）の浴槽にチューブが十分浸かるように設置し、周波数40kHz、強度0.25W/cm²で1分間超音波を照射し、照射後、

30分間、4℃で放置した。

【0068】このように超音波処理し混合物を40μm孔のナイロンメッシュで濾過し、さらに、R2D2培地5mlを加えて洗浄しこの操作を3回くりかえし、GUS遺伝子を導入したカルスを得た。

【0069】（2）分裂細胞の培養

GUS遺伝子を導入したカルスを3.5cmのシャーレに入れ、R2D2培地を3ml加えて、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）にて、ロータリーシェーカー（50rpm/分）を用いて培養し、分裂細胞を得た。

【0070】（3）形質転換細胞数の選抜

GUS遺伝子が導入された細胞数の測定は、次のようにして行った。すなわち、上記（2）の分裂細胞の培養において、培養2日目にR2D2液体培地のみを取り除き、シャーレ中にカルスのみを残し、1mM X-Glu（5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucronide）溶液300μlをシャーレ中へ添加し、36℃、暗所で、24時間放置し、酵素反応を行った。このGUSアッセイにより、カルス中の、GUS遺伝子が導入され形質転換された細胞のみが青く発色されるので、これらの細胞を顕微鏡下で選抜し、形質転換細胞数を調べた。その結果を表1に示した。

【0071】

【実施例2】チタン酸カリウム製ウイスカ（チタン工業株式会社の製品「LS20」）1gを500ml容ナス型フラスコに入れ、トルエン100mlを加え、さらに3-（2-アミノエトキシ）アミノプロピル-トリメトキシシラン（カップリング剤）1gを加え溶解した後、このフラスコ内のトルエンの温度を120℃となるようにしてシリコンオイルバス中で攪拌し、トルエンを留去し、スラリーを得た。

【0072】反応後、スラリーを90%メタノールで洗浄し、過剰のカップリング剤を取り除いた。さらに洗浄に用いたメタノールの残液をロータリーエバポレーターで完全に留去し、表面塩基性ウイスカを得た。

【0073】上記で得た表面塩基性ウイスカは実施例1と同様の方法で殺菌した後、R2D2培地を加えて混合物を得た。

【0074】GUS遺伝子20μgを含むTE緩衝液20μlにR2D2培地40μlを加え、この溶液にポリオルニチン2.5μg、スペルミジン50μg、スペルミン18μg、ヒストンH2 20μgを、それぞれ単独にR2D2培地60μlに溶解して加え、室温で10分間静置し、4種類のGUS遺伝子の塩基性複合体を調製した。

【0075】これらのGUS遺伝子の塩基性複合体と上記の表面塩基性ウイスカの混合物を用いて実施例1と同様の方法で形質転換細胞を得て、GUSアッセイを行い

形質転換細胞数を調べた。その結果を表1に示した。

【0076】

【比較例1】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例1に準じて分裂細胞のGUSアッセイを行い形質転換細胞をえた。その結果を表1に示した。

【0077】

【比較例2】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例1に準じて、分裂細胞のGUSアッセイを行い形質転換細胞を得た。その結果を*10

*表1に示した。

【0078】

【比較例3】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 μ lと外来遺伝子溶液20 μ l、R2D2培地100 μ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例1と同様にして分裂細胞のGUSアッセイを行い、形質転換細胞を得た。その結果を表1に示した。

【0079】

【表1】

表1

	遺伝子導入操作	効果の有無	外来遺伝子と複合体を形成する塩基性物質	形質転換細胞数
実施例1	遠心処理+超音波処理	有	なし	861
実施例2	同上	有	ポリオルニチン	3,099
	同上	有	スベルミン	2,913
	同上	有	スベルミジン	3,510
	同上	有	ヒストン	1,542
比較例1	遠心処理のみ	有	なし	9
比較例2	超音波処理のみ	有	なし	9
比較例3	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0

【0080】

【実施例3】

(1) 供試植物細胞の調製は実施例1に準じて行った。

(2) ウイスカの調製は実施例1に準じて行った。

(3) 外来遺伝子の調製

外来遺伝子は、ハイグロマイシン耐性遺伝子保有のプラスミドpCH（東京大学より分譲）を用いた。

(4) ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入操作は、実施例1に準じて行った。

【0081】(5) 分裂細胞の培養

ハイグロマイシン耐性カルスを3.5cmのシャーレに入れ、R2D2培地を3ml加えて、28℃、明所

(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)にて、ロータリーシェーカー(50rpm/分)を用いて培養し、分裂細胞を得た。

【0082】(6) 形質転換細胞の選抜

上記(5)に準じて培養を行い、培養3日目に、これら

の分裂細胞の懸濁液3mlを2,4-PA 2mg/リットル、ショ糖30g/リットル、ゲルライト3g/リットル、およびハイグロマイシン50mg/リットルを含むN6培地(pH5.8)30mlを直径9cmの大きさのシャーレ中で固化させた固体培地上に均一に広げた後、ピペットで懸濁液の液体を吸い取った。

【0083】これを28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で20日間培養し、ハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た。

【0084】(7) 形質転換細胞から植物体再生

上記により得た形質転換培養細胞169個(直径約5mmに生育)をペンシルアデニン2mg/リットル、ナフタレン酢酸1mg/リットル、ショ糖30g/リットル、ソルビトール30g/リットル、ゲルライト3g/リットルを含むMS培地30mlを直径9cmの大きさのシャーレで固化させた再生用培地上に1シャーレ当たり10個置床し、28℃、明所(2,000ルクス、1日当たり16時間照明)で30日間培養すると、形質転

換細胞から芽と根が再生した。

【0085】再生した芽と根を含む幼芽（長さ10～30mmに生育）をショ糖3%、ゲルライト3g/リットルを含むMS培地50mlをプラントボックス（縦5cm×横5cm×高さ10cm）中で固化させた固体培地に各々1本ずつ移植し、20日間培養して形質転換植物を135個体得た。その結果を表2に示す。

【0086】（8）形質転換植物の遺伝子解析 PCR (polymerase chain reaction) 法によるハイグロマイシン耐性遺伝子を保持する植物体の解析を行った。

【0087】上記（7）で得た再生植物体の葉50mgを1.5ml容のマイクロチューブに入れ、10mM EDTAを含む20mM Tris-HCl緩衝液（pH7.5）300μlを添加し、これを磨砕した後、20%SDSを20ml加えて、65℃で10分間加温した。これに5M酢酸カリウムを100μl加え、水中に20分間置いた後、1,7000×gの遠心加速度で20分間遠心分離を行い、得られた上清にイソプロパノール200μlを加え、転倒攪拌し、これを再び1,7000×gの遠心加速度で20分間遠心分離し、この沈殿を減圧下で乾燥させ、100μlのTE緩衝液に溶解しDNAを得た。

【0088】PCR用のプライマーとして、公知のハイグロマイシン耐性遺伝子の配列を基に、配列番号1及び2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドを合成した。次に、これらのオリゴヌクレオチド各1μMをプライマーとし、上記植物体由来のDNA5μlをテンプレートとして、これらを含む反応液（10mM Tris-HCl（pH8.3）、1.0mM MgCl₂、50mM KCl、0.01%ゼラチン、pH8.3、dNTP 各0.2mM mixture、Taq DNA polymerase 2.5ユニット）100μlで、増幅反応を行った。反応液は、PCRキット（PCR Amplification Kit（宝酒造（株）社製）を用いて調製した。

【0089】増幅反応は、PCR反応装置（Program Temp Control System PCR-700（アズテック社製））を用いて、変性94℃、1分、アニーリング60℃、30秒、伸張（extension）72℃、1分の3つの反応条件を30回繰り返して行った。

【0090】PCR反応液を常法によりアガロース電気泳動で分析したところ、再生植物から抽出したDNAから375bpの増幅されたDNAバンドが確認された。このDNAバンドパターンより、イネ再生植物体135個体中の全てにハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認できた。その結果を表2に示す。

【0091】

【実施例4】

（1）供試植物細胞の調製

トウモロコシ（品種A188）の交配10日目の未熟胚（1～1.2mm長）を無菌状態に取り出し、N6培地の無機成分組成にショ糖20g/リットル、2,4-P A 2mg/リットル、L-プロリン2.9g/リットル、カサミノ酸100mg/リットル、寒天9g/リットルを添加して得た培地（pH5.8）を直径9cmの大きさのシャーレ中で固化させた固体培地（以下、「N6S2培地」と略す）上に、1シャーレ当たり9個置床し、28℃、暗所で、21日間培養し、カルスを得た。

【0092】「（2）ウイスカの調製」および「（4）ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入操作」は実施例1に準じて、また、「（3）外来遺伝子の調製」は実施例2に準じて行った。

【0093】（5）分裂細胞の培養

ハイグロマイシン耐性カルスを個々にピンセットでN6S2培地上に置床し、28℃、暗所で7日間培養し分裂細胞を得た。

【0094】（6）形質転換細胞の選抜

上記（5）に準じて培養し、培養7日目のカルスを分割せずにそのままハイグロマイシン50mg/リットルを添加したN6S2培地に移植し、28℃暗所で30日間培養しハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た。

【0095】（7）形質転換細胞からの植物体の再生

上記（6）により得た形質転換培養細胞101個（直径約5mmに生育）を、ショ糖10g/リットル、ゲルライト3g/リットルを含む1/2無機塩濃度のN6培地（pH5.8）に直径9cmの大きさの1シャーレ当たり6個のカルスを置床し、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）で30日培養すると、形質転換培養細胞から芽と根が再生した。

【0096】再生した芽と根を含む幼芽（長さ10～30mmに生育）をショ糖30g/リットル、ゲルライト3g/リットルを含むMS培地50mlをプラントボックス（縦5cm×横5cm×高さ10cm）中で固化させた固体培地に各々1本ずつ移植し、20日間培養して形質転換植物を30個体得た。その結果を表2に示す。

【0097】（8）形質転換植物の遺伝子解析

実施例2の方法に準じて解析を行ったところ、トウモロコシ再生植物体30個体中26個体にハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された。その結果を表2に示す。

【0098】

【比較例4】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例3と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0099】

【比較例5】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例3と同様にして分裂細胞

のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0100】

【比較例6】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、

1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 μ lと外来遺伝子溶液20 μ l、R2D2培地100 μ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例3と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0101】

【比較例7】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例4と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0102】

【比較例8】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例4と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0103】

【比較例9】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、

1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 μ lと外来遺伝子溶液20 μ l、N6S2培地100 μ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例4と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0104】

【実施例5】

(1) 供試植物細胞の調製

芝草ベントグラス（品種ペンクロス）の完熟種子を70%エタノール溶液に10秒間、次いで有効塩素約1%次亜塩素酸ナトリウム溶液に20分間浸漬して殺菌処理をした後、滅菌水で洗浄し、B5培地の無機成分組成にショ糖30g/リットル、2, 4-PA 3mg/リットル、ゲルライト3g/リットルを添加して得た培地（pH5.8）を直径9cmの大きさのシャーレ中で固化させて固体培地（以下、「B5D3培地」と略す）上に、1シャーレ当たり100個置床し、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）で、60日間培養し、カルスを得た。

【0105】「(2) ウイスカの調整」および「(4) ハイグロマイシン耐性遺伝子の導入操作」は実施例1に準じて、また、「(3) 外来遺伝子の調製」は実施例2に準じて行った。

【0106】(5) 分裂細胞の培養

ハイグロマイシン耐性カルスを個々にピンセットでB5D3培地上に置床し、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）で7日間培養し分裂細胞*

*を得た。

【0107】(6) 形質転換細胞の選抜

上記(5)に準じて培養し、培養7日目のカルスを分割せずにそのままハイグロマイシン50mg/リットルを添加したB5D3培地に移植し、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）で40日間培養しハイグロマイシン耐性の形質転換細胞を得た。

【0108】(7) 形質転換細胞からの植物体の再生

上記(6)により得た形質転換培養細胞57個（直径約1cmに生育）をショ糖30g/リットル、ソルビトル30g/リットル、ベンジルアデニン0.3mg/リットル、ナフタレン酢酸0.3mg/リットル、ゲルライト3g/リットルを含む1/2無機塩濃度のMS培地（pH5.8）に直径9cmの大きさのシャーレ当たり6個のカルスを置床し、28℃、明所（2,000ルクス、1日当たり16時間照明）で50日間培養すると、形質転換培養細胞から芽が再生した。

【0109】再生した芽（長さ3~5mmに生育）をショ糖30g/リットル、ゲルライト3g/リットルを含む1/2無機塩濃度のMS培地30mlを試験管（縦15cm×直径4cm）中で固化させた固体培地に各々1本づつ移植し、30日間培養すると、生育した芽の基部に根が形成した形質転換植物を49個体得た。その結果を表2に示す。

【0110】(8) 形質転換植物の遺伝子解析

実施例3の方法に準じて解析を行ったところ、芝草の再生植物体49個体中44個体にハイグロマイシン耐性遺伝子が組み込まれていることが確認された。その結果を表2に示す。

30 【0111】

【比較例10】遺伝子導入時に遠心処理のみを行い、超音波処理を省いた以外は、実施例5と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0112】

【比較例11】遺伝子導入時に遠心処理を省き、超音波処理のみを行った以外は、実施例5と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

40 【0113】

【比較例12】遺伝子導入時にウイスカの添加を省き、1. 5ml容チューブに1mm以下のカルスPCV 250 μ lと外来遺伝子溶液20 μ l、B5D3溶液100 μ lを入れて得た混合物を用いた以外は、実施例5と同様にして分裂細胞のハイグロマイシン耐性の形質転換細胞数を調査し、その結果を表2に示した。

【0114】

【表2】

表2

	植物種	遺伝子導入操作	ウイスカの有無	外来遺伝子と複合体を形成する塩基性物質	形質転換細胞数 (ハイグロマイシン耐性数)	再生植物体数
実施例3	イネ	遠心処理+超音波処理	有	なし	169	195
比較例4	イネ	遠心処理のみ	有	なし	0	0
比較例5	イネ	超音波処理のみ	有	なし	0	0
比較例6	イネ	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0	0
実施例4	トリモロツ	遠心処理+超音波処理	有	なし	101	26
比較例7	トリモロツ	遠心処理のみ	有	なし	0	0
比較例8	トリモロツ	超音波処理のみ	有	なし	0	0
比較例9	トリモロツ	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0	0
実施例5	芝草	遠心処理+超音波処理	有	なし	57	44
比較例10	芝草	遠心処理のみ	有	なし	0	0
比較例11	芝草	超音波処理のみ	有	なし	0	0
比較例12	芝草	遠心処理+超音波処理	なし	なし	0	0

【0115】

【発明の効果】本発明によれば植物の種、品種、系統に左右されず、容易かつ短時間に植物の形質転換を行うことができ、効率よく形質転換植物を作出することができる。

【0116】

【配列表】

配列

GCTGGGGCGT CGGTTTCCAC TATCCG

26

【0117】配列番号：2

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

配列

CGCATAACAG CGGTCATTGA CTGGAGC

27

* 配列番号：1

配列の長さ：26

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

* アンチセンス：NO

※ トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸 合成DNA

アンチセンス：YES

※